

Nieuwe soorten, bestuivingsbiologie en farmaceutisch potentieel van orchideeën uit de Himalaya

Nieuw ontdekte Coelogyninae uit de Himalaya

Orchideeën uit de Himalaya worden al meer dan twee eeuwen bestudeerd. Inventarisaties concentreerden zich tot nog toe vooral op relatief toegankelijke gebieden in India, Nepal en Bhutan. De orchideeën van minder toegankelijke gebieden zoals de provincie Yunnan in China, het noordelijke deel van Myanmar, en de hoger gelegen delen van Nepal zijn minder goed bestudeerd. Deze gebieden waren voorheen niet toegankelijk voor buitenlanders. Lokale taxonomen beginnen daar pas de laatste jaren inventarisaties uit te voeren. In het onderzoek uitgevoerd voor dit proefschrift werden drie soorten en vier ondersoorten van *Coelogyne* uit India, Yunnan en Myanmar en één soort *Panisea* uit Nepal ontdekt die nieuw voor de wetenschap zijn.

De soortgrenzen van veel orchideeën uit Nepal zijn onduidelijk. Schrijvende voorbeelden zijn bij kwekers geliefde soorten uit *Coelogyne* sectie *Ocellatae* en dan met name *C. corymbosa*, *C. nitida* en *C. punctulata*. In dit proefschrift is een taxonomische revisie uitgevoerd van de betreffende sectie. Hierbij werd ontdekt dat de verwarring over de bovengenoemde soorten ontstond doordat de type exemplaren op één herbariumvel geplakt zijn. Veel kwekers geven hun planten de verkeerde naam: *C. ochracea* (een synoniem van *C. nitida*) of *C. nitida* in plaats van *C. punctulata*. Deze foute determinaties zijn gebaseerd op verouderde literatuur. In dit proefschrift wordt beschreven dat *C. punctulata* heel gemakkelijk herkend kan worden aan de hysteranthe bloeiwijze. Een dergelijke bloeiwijze ontstaat pas bovenop volgroeide pseudobulben met bladeren. Aan de basis van deze bloeiwijze zit bovendien een steriele bractee. *Coelogyne nitida* and *C. corymbosa* hebben proteranthe of synanthe bloeiwijzen. Deze bloeiwijzen ontstaan al voordat de pseudobulben en bladeren zich ontwikkelen. De meest basale bractee heeft bovendien altijd een bloem. Laatstgenoemde soorten kunnen van elkaar onderscheiden worden door de details van de kielen op de lip van de bloemen.

Bestuivingsbiologie van Coelogyninae in Nepal

Er bestaan nauwelijks waarnemingen van bestuivers van *Coelogyne* soorten, alleen maar hypothesen. De bloemen zijn tweezijdig symmetrisch, vaak geel of wit, hebben een landingsplatform, een zoete geur en een honingmerk. Deze kenmerken suggereren adaptatie aan bijen. Tijdens veldwerk in Nepal ontdekten we dat *Coelogyne flaccida* en *C. nitida* door wilde bijen (*Apis cerana*) bestoven werden en *Otochilus albus* door hommels (*Bombus kashmirensis*). Deze bestuivers werden vooral aangetrokken door de zoet geurende bloemen en mogelijk de helder gekleurde gele vlekken op de bloemen; er werd verder geen beloning aangeboden. Bloemen in gazen kooitjes konden niet bestoven worden en ontwikkelden geen vruchten. Deze *Coelogyninae* lijken daarom bestuivers nodig te hebben voor zaadzetting.

Aan de basis van de bloemen van Coelogyninae worden kleine vloeistofdruppeltjes afgescheiden. Deze vloeistof wordt niet verzameld door bijen en hommels maar door agressieve mieren. Afscheiding vindt plaats uit speciaal gemodificeerde huidmondjes. Deze gemodificeerde huidmondjes waren al eerder waargenomen bij de niet verwante epifytische orchideeëngeslachten *Catasetum* en *Epidendrum*. Met behulp van analyses met licht-, scanningelektronen en transmissie-elektronenmicroscop werd in dit onderzoek ontdekt dat deze vloeistof van het floëem naar de huidmondjes diffundeert via openingen tussen de cellen van het parenchym. Slecht op enkele plaatsen in de epidermis werden gemodificeerde huidmondjes gevonden: alleen direct onder de bloemsteeltjes. Hierdoor druppelt alleen vlak onder de bloemen vloeistof naar buiten. Door ons uitgevoerde experimenten met Fehlings' reagens lieten zien dat de vloeistof hoge concentraties suikers bevat en als extraflorale nectar kan worden beschouwd. Eerder onderzoek aan andere plantensoorten liet al zien dat deze planten door nectarverzamelende mieren beschermd worden tegen herbivoren. De resultaten van onze inventarisaties en experimenten in het veld in Nepal lieten hetzelfde zien. Exemplaren van *C. nitida* die in bomen groeiden met mierennesten werden significant minder aangetast door vraatzuchtige kevers dan exemplaren in mierenvrije bomen. Planten waarvan de afgifte van extraflorale nectar met plakband was geblokkeerd werden significant meer opgegeten dan controleplanten zonder behandeling.

Farmaceutisch potentieel en illegale handel in orchideeën uit Nepal

Orchideeën staan al lang bekend als medicinale planten in China en India. In Nepal zijn al meer dan 590 artikelen gepubliceerd over ethnobotanie. In dit indrukwekkende aantal publicaties is nog weinig gedocumenteerd over het traditionele gebruik van wilde orchideeënsoorten. Wij ontdekten dat 59 orchideeënsoorten gebruikt worden voor het behandelen van minstens 38 verschillende ziektes in Nepal. *Coelogyne*, *Dendrobium*, *Cymbidium*, *Bulbophyllum*, *Habenaria*, *Malaxis* en *Pholidota* werden het meest gebruikt voor de productie van traditionele medicijnen. Interviews met Nepalezen brachten aan het licht dat wilde orchideeënsoorten gebruikt worden voor de bereiding van energie- en lustopwekkende middelen en behandeling van brandwonden, verzwikkingen, botbreuken, hoofdpijn, koorts, schrammen en diepe wonden. Nog eens 25 wilde orchideeënsoorten werden gebruikt als veevoer en 6 soorten als groenten en als onderdeel van rituele gebruiken.

Een door ons uitgevoerde antibacteriële screening met extracten van Nepalese orchideeën toonde aan dat 94% van de onderzochte soorten de groei van ziekteverwekkers net zo goed kon afremmen als dure antibiotica. *Aerides multiflora*, *Calanthe puberula*, *Coelogyne flaccida*, *Coelogyne nitida*, *Coelogyne punctulata*, *Coelogyne stricta*, *Cymbidium iridioides*, *Dendrobium erriiflorum*, *Flickingeria fugax*, *Luisia trichorhiza* en *Pholidota imbricata* konden de groei remmen van een breed spectrum aan ziekteverwekkers. Dit experiment laat zien dat de traditionele kennis van de inheemse bevolking van Nepal niet alleen maar op bijgeloof is gebaseerd maar perspectieven biedt voor de ontwikkeling van alternatieve geneesmiddelen.

In totaal bleken 61 wilde orchideeënsoorten illegaal verhandeld te worden op de vier markten die door ons onderzocht werden in het centrale gedeelte van Nepal. Circa 10% van in beslag genomen orchideeën is meestal niet op naam te brengen omdat de planten niet bloeien. Voor traditionele determinatiesleutels moeten bloemkenmerken worden gebruikt. Het lukte ons toch om deze 10% tot op soortniveau te determineren

door het toepassen van DNA barcodering en chemische profilering. We schatten dat in de periode 2008-2009 zo'n 28 ton aan wilde orchideeën illegaal geëxporteerd werd naar China en India en dat lokale orchideeënverzamelaars daar veel geld mee verdienen. Vooral kinderen en vrouwen worden bij het verzamelen van wilde orchideeën betrokken. Lokale Nepalezen of buitenlanders verzorgen de export. Die piek van het verzamelen en verhandelen is van januari tot maart en juli tot oktober. *Acampe*, *Aerides*, *Coelogyne*, *Crepidium*, *Dactylorhiza*, *Dendrobium*, *Gastrodia*, *Eulophia*, *Flickingeria*, *Otochilus*, *Pholidota*, *Satyrium* en *Vanda* zijn het meest populair voor verwerking in traditionele Chinese medicijnen. *Coelogyne*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Pholidota* en *Vanda* worden vooral gebruikt als sierbloemen. Slechts een klein aantal bedrijven in Nepal heeft weefselkweekfaciliteiten. Geen van deze bedrijfjes kweekt medicinale orchideeën omdat de focus op het kweken van hybriden voor de sierteelt ligt.

Conclusies

Een fylogenetische analyse op basis van DNA sequenties liet zien dat *Coelogyne* sectie *Ocellatae* monofyletisch is voor in ieder geval de soorten waarvan DNA geanalyseerd kon worden. De sectie is dus uit een gemeenschappelijke voorouder ontstaan en de naamgeving hoeft daarom niet aangepast te worden. De oogvormige vlek op de lip van de bloem is een goed kenmerk waaraan soorten uit deze sectie herkend kunnen worden. De soorten verschillen van elkaar in het type bloeiwijze (hysteranth, proteranth of synanth), de aan- of afwezigheid van een steriele bractee op de bloeiwijze en de vorm van de kielen op de lip van de bloem. Veel soorten in deze sectie worden bedreigd door illegale handel. De geïllustreerde determinatiesleutels in dit proefschrift kunnen bijdragen aan een betere identificatie van in beslag genomen materiaal en de controle op illegale handel verscherpen.

Extraflorale nectar van Coelogyneae bleek een belangrijke rol te spelen bij het aantrekken van agressieve mieren. De mieren beschermen deze orchideeën tegen vraatzuchtige kevers. De nectar bleek uit speciale huidmondjes te druppelen. Deze aangepaste huidmondjes bevinden zich maar op een paar plaatsen in de epidermis van de bloeiwijze, namelijk vlak onder de bloemsteeltjes. Veldwerk in Nepal toonde aan dat *C. flaccida* en *C. nitida* en *O. albus* bestoven worden door *Apis cerana* en *Bombus kashmirensis*. Informatie over de natuurlijke bestuivers, herbivoren en natuurlijke vijanden van deze herbivoren is cruciaal om bedreigde orchideeënsoorten in Nepal voor uitsterven te behoeden. Bezoeken aan plantenmarkten in Nepal toonden aan dat veel orchideeënsoorten illegaal verhandeld worden. Jaarlijks verdwijnt 28 ton orchideeën de grens over naar China en India voor verwerking in traditionele Chinese medicijnen waaraan veel geld verdiend wordt. Een groot aantal wilde orchideeënsoorten blijkt gebruikt te worden voor de bereiding van traditionele medicijnen in Nepal. Een door ons uitgevoerde antibacteriële screening met extracten van Nepalese orchideeën toonde aan dat het merendeel van de onderzochte soorten de groei van ziekteverwekkers net zo goed kon afremmen als dure antibiotica.

We adviseren het opzetten van ecologisch verantwoorde bedrijven voor het kweken van medicinaal gebruikte orchideeën. Momenteel worden alleen artificiële orchideeën hybriden gekweekt in Nepal voor de sierteelt. Kweek van medicinaal gebruikte orchideeën zal uitsterven van bedreigde soorten in het wild helpen voorkomen en het verzamelen van orchideeën materiaal ecologisch meer verantwoord maken. Onze antibacteriële screening toonde aan dat het gebruik van wilde orchideeën als traditioneel medicijn

zeker niet alleen maar op bijgeloof gebaseerd is. De weinige klinische studies die tot nog toe zijn uitgevoerd met orchideeënextracten toonden ook aan dat orchideeën een groot farmaceutisch potentieel hebben. Het kweken van medicinaal gebruikte orchideeën is een nog volledig onontwikkelde niche op de internationale markt en de ontwikkeling van deze niche verdient meer aandacht. Circa 10% van in beslag genomen orchideeën is meestal niet op naam te brengen omdat de planten niet bloeien. Deze 10% kon toch tot op soortniveau gedetermineerd worden door het toepassen van DNA barcodering en chemische profilering. We adviseren deze technieken breder toe te passen voor het vinden van meer bewijs voor illegale handel in wilde orchideeën.